

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-62332

(43)公開日 平成10年(1998) 3月6日

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>

G 0 1 N 15/14

識別記号

庁内整理番号

F I

G 0 1 N 15/14

技術表示箇所

D

審査請求 未請求 請求項の数5 O L (全 8 頁)

(21)出願番号 特願平8-223358

(22)出願日 平成8年(1996) 8月26日

(71)出願人 000138200

株式会社モリテックス

東京都渋谷区神宮前3丁目1番14号

(71)出願人 390014535

新技術事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(72)発明者 鹿野 修司

神奈川県横浜市都筑区茅ヶ崎東三丁目6番

32号 株式会社モリテックス港北技術セン

ター内

(74)代理人 弁理士 澤野 勝文 (外1名)

最終頁に続く

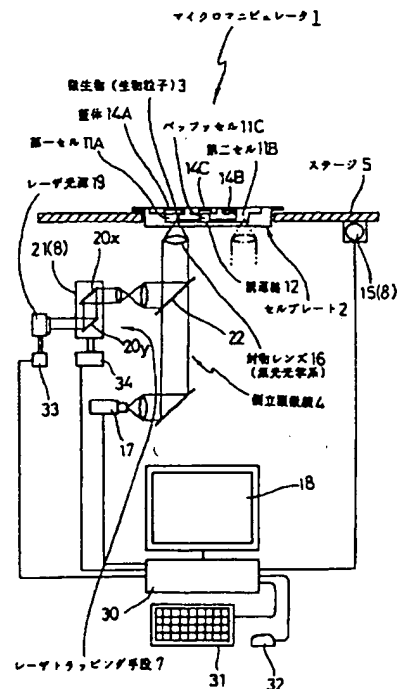
(54)【発明の名称】 レーザトラッピング装置及びこれを利用したマイクロマ

ニビュレータ

(57)【要約】

【課題】可視光領域の波長のレーザ光を用いて生物粒子を生物損傷を起こすことなく光学トラップすることができるようにする。

【解決手段】 微小検体を光学トラップするために照射するレーザ光の波長を、600nm以上の可視光にした。その波長は、生物粒子を構成する蛋白質や核酸に吸収される150～300nmの範囲外であり、また、2光子吸収により吸収される300～600nmの範囲外でもあるため、色素を持たない生物粒子を光学トラップする場合に、生物損傷が生ずることがない。また、可視光を使用しているため、その光路を視認することができ、光軸合わせが簡単で、安全性も高い。さらに、色素を有する生物粒子を光学トラップするために照射するレーザ光の波長が、600nm以上の可視光で、且つ、その色素により吸収しない光の波長に選定されているので、やはり、生物損傷を生ずることがない。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 微小検体が浮遊する媒質中に焦点位置を有する集光光学系(16)を通して前記媒質中にレーザ光を照射し、当該レーザ光を前記集光光学系(16)の焦点位置に集光させてその焦点位置にある微小検体(3)を光学的にトラップするレーザトラッピング装置において、前記レーザ光の波長が、可視光領域に含まれ、且つ、600nm以上に選定されていることを特徴とするレーザトラッピング装置。

【請求項2】 微小検体が浮遊する媒質中に焦点位置を有する集光光学系(16)を通して前記媒質中にレーザ光を照射し、当該レーザ光を前記集光光学系(16)の焦点位置に集光させてその焦点位置にある微小検体(3)を光学的にトラップするレーザトラッピング装置において、前記微小検体として色素を有する生物粒子を光学的にトラップする場合に、前記レーザ光の波長が、600nm以上で、且つ、その微小検体の色素により吸収されない波長に選定されていることを特徴とするレーザトラッピング装置。

【請求項3】 セルプレート(2)に保持させた媒質液に分散浮遊している微小検体中から任意の微小検体(3)を分離するマイクロマニピュレータであって、前記セルプレート(2)は、そのプレート本体(10)に、多数の微小検体が分散浮遊した媒質液を貯留する第一セル(11A)と、微小検体が浮遊しない媒質液を貯留する第二セル(11B)が、夫々その上面を開口して所定間隔離れて形成されると共に、微小検体の自由移動を阻止する狭小な誘導路(12)を介して互いに連通され、当該セルプレート(2)の第一セル(11A)に貯留された媒質液中に焦点位置を有する集光光学系(16)を通して、波長が可視光領域に含まれ、且つ、600nm以上に選定されたレーザ光を照射し、当該レーザ光を前記集光光学系(16)により集光させてその焦点位置にある微小検体(3)を光学的にトラップするレーザトラッピング手段(7)と、

当該レーザトラッピング手段(7)により微小検体(3)をトラップした状態で、セルプレート(2)を移動させるか又はレーザ光を走査させて、当該微小検体(3)を前記第一セル(11A)から前記誘導路(12)を通して前記第二セル(11B)に移動させる検体分離手段(8)とを備えたことを特徴とするマイクロマニピュレータ。

【請求項4】 微小検体として色素を持つ生物粒子を用い、セルプレート(2)に保持させた媒質液に分散浮遊している微小検体中から任意の微小検体(3)を分離するマイクロマニピュレータであって、前記セルプレート(2)は、そのプレート本体(10)に、多数の微小検体が分散浮遊した媒質液を貯留する第一セル(11A)と、微小検体が浮遊しない媒質液を貯留する第二セル(11B)が、夫々その上面を開口して所定間隔

離れて形成されると共に、微小検体の自由移動を阻止する狭小な誘導路(12)を介して互いに連通され、

当該セルプレート(2)の第一セル(11A)に貯留された媒質液中に焦点位置を有する集光光学系(16)を通して、波長が600nm以上で、且つ、その微小検体の色素により吸収しない波長に選定されたレーザ光を照射し、当該レーザ光を前記集光光学系(16)により集光させてその焦点位置にある微小検体(3)を光学的にトラップするレーザトラッピング手段(7)と、

当該レーザトラッピング手段(7)により微小検体(3)をトラップした状態で、セルプレート(2)を移動させるか又はレーザ光を走査させて、当該微小検体(3)を前記第一セル(11A)から前記誘導路(12)を通して前記第二セル(11B)に移動させる検体分離手段(8)とを備えたことを特徴とするマイクロマニピュレータ。

【請求項5】 前記セルプレートは、プレート本体(10)に、微小検体が分散浮遊した媒質液を貯留する第一セル(11A)と、微小検体が浮遊しない媒質液を貯留する第二セル(11B)が、夫々その上面を開口して所定間隔離れて形成されると共に、微小検体の自由移動を阻止する狭小な誘導路(12)を介して互いに連通され、前記各セル(11A, 11B)の上面開口部が、水平方向にスライドする蓋体(14A~14C)で開閉される請求項3及び4記載のマイクロマニピュレータ。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、レーザ光を集光光学系によりその焦点上に集光させて微小検体が浮遊する媒質中に照射し、その焦点位置にある微小検体を光学的にトラップするレーザトラッピング装置とこれを利用したマイクロマニピュレータに関する。

## 【0002】

【従来の技術】従来より、赤外光の波長のレーザ光を光源として生物粒子を光学トラップすることが行われている(特公平5-6136号公報参照)。これは、可視光レーザ(Arレーザ:波長514nm)を光源として生物粒子をトラップしたときは光による生物損傷が観察されたのに対し、赤外光レーザ(YAGレーザ:波長1064nm)を光源として生物粒子をトラップしたときには光による生物損傷が観察されなかったというAshkinらの実験結果に基づくものである。

【0003】しかしながら、赤外光レーザを用いた光学トラップは、可視光を用いた光学トラップと比べると以下のような問題点がある。第一に、可視光は目に見えるので目に入ったときには瞼を閉じたり光線を遮ることで危険を回避できるのに対し、赤外光は目に見えないため目に入ったことに気付かず目を損傷しやすい。第二に、可視光は視認できるので装置をセットしたときに光学系の調整が容易であるのに対し、赤外光は視認できないの

で光学系の調整が困難である。第三に、一般に波長が長いほどトラップ力が弱く、例えば、粒径 $3\mu\text{m}$ のポリスチレンラテックス粒子の場合、YAGレーザ（赤外光：波長 $1064\text{nm}$ ）のトラップ力は、赤色光（可視光：波長 $600\text{nm}$ ）のトラップ力より25%小さく、粒径 $1\mu\text{m}$ の場合は、YAGレーザのトラップ力は赤色光のトラップ力に比して45%も小さい。第四に、光学トラップは対物レンズ（集光光学系）の焦点位置で行われ、この焦点位置のビームスポット径は波長に比例し、波長が長い程ビームスポット系は大きくなるので、可視光に比して赤外光の方が小さい検体をトラップしにくくなる。第五に、レーザトラッピング装置に使用するレンズ、ミラーその他の光学要素は、低コストに抑えるために一般顕微鏡用の汎用品を使用しており、これらは、可視光領域の光を対象として設計されているため、赤外線領域の光を使用した場合には、光の透過率が低下してレーザ光の利用効率下がらただけでなく、収差が増えて集光性が低下してしまう。例えば、100倍の対物レンズの場合、赤色光（可視光：波長 $600\text{nm}$ ）の透過率は90%以上あるが、YAGレーザ（赤外光：波長 $1064\text{nm}$ ）の光透過率は30%以下まで下がるため、同じ強度の光を照射しようとするれば赤外光は可視光の三倍程度の出力の光源を使用しなければならない。また、赤外光を使用した場合には、レンズの収差が大きくなることにより、焦点位置におけるビームスポット系が大きくなり、小さい検体のトラップ力が低下してしまう。ただし、これらはいずれもレンズ設計の問題であり、赤外線の透過率を向上させたり、収差を低く抑えるように設計することはもちろん技術的に可能であり、そのような赤外線専用の光学レンズを使用すれば、光の透過率や収差の問題は解消されるが、専用品を設計製作した場合にはコストが高まり、装置全体の価格が高くなるという別の問題を生ずる。

【0004】このように赤外光は可視光に比して多くの欠点があるにもかかわらず、生物粒子の光学トラップに用いられているのは、生きた状態で一つの個体を分離する要望が高いからである。例えば、微小検体となる大腸菌は遺伝子操作を行うために頻繁に使用されるが、この場合に、所定の媒質液中に分散させて遺伝子操作を行った後、媒質液中に分散する大腸菌を媒質液ごとマイクロピペット等で吸入し、これを培養槽に移植して培養し、大量のDNAを複製させるようにしている。しかし、媒質液中に分散している大腸菌は、個体差により、その全てが遺伝子操作されているわけではなく、これをマイクロピペットで吸入するときには同時に多数の大腸菌を吸入してしまうため、培養された大腸菌は遺伝子操作されたものとされないものが混合した状態になり、遺伝子操作されたものの収率が低い。したがって、1個の大腸菌から培養することができればこれを純粋培養することができるので、その大腸菌が遺伝子操作されていれば、遺

伝子操作された大腸菌だけを収率100%で得ることが可能になる。

【0005】ここで、1個の大腸菌を取り出すために光学トラップの技術を用いる場合、大腸菌を生きた状態のまま取り出すことが前提になるが、前述したAshkinの他、坂野らの研究（静電気学会論文集／1991年10月）によっても、大腸菌にArレーザ光を $0.64\text{mW}/\mu\text{m}^2$ で照射した場合、約7秒で動きが停止しているのに対し、YAGレーザを倍の強度の $1.28\text{mW}/\mu\text{m}^2$ で2時間以上照射しても動きは止まっていないと報告されており、波長 $514\text{nm}$ と波長 $1064\text{nm}$ とで光損傷を比較し、赤外光領域の波長が可視光領域の波長に比して生物の光損傷に対して安全であると結論付けていることから、可視光領域の波長の光による生物粒子の光学トラップの可能性は否定されていた。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、可視光領域の波長の光を用いて生きたまま大腸菌をトラップすることができれば、上述したように、赤外線領域の光を使用する場合に比して、数多くの利点がある。そこで、本発明者らは、生物に照射されるレーザ光の波長とその生物の光損傷の関係を研究した。まず、F. Bryantの研究（Archives of biochemistry and biophysics Vol.135 / 1969 : Absolute optical cross sections of cells and chloroplasts）によれば、大腸菌やイースト菌の分光吸光度は可視光領域で変化するが、この原因は菌の光の吸収によるものではなく光の散乱によるものであることが報告されている。また、本発明者らが積分球を用いた分光光度計を用いてより広い波長範囲 $200\sim 1100\text{nm}$ の光で同様の実験を行ったところ、図4に実線で示すように分光吸光度は波長に応じて変化し、これより、大腸菌やイースト菌は波長 $300\text{nm}$ 以下の光に対して光吸収が大きく、それ以上の光に対しては $1100\text{nm}$ までの波長領域で光吸収は非常に小さく、しかも、波長による吸収の差はほとんどないことが確認された。したがって、Ashkinらや坂野らの報告で生物損傷が観察されたArレーザ（可視光：波長 $514\text{nm}$ ）のレーザ光の波長は、大腸菌などに照射しても光吸収のない $300\sim 1100\text{nm}$ の領域内であり生物損傷はない筈であるが、現実には生物損傷が観察されていることから、この生物損傷は通常的光吸収によるものではない非線形なものであることが推定される。一方、坂野らが実験で用いた光パワー密度 $0.64\text{mW}/\mu\text{m}^2$ （ $=64\text{W}/\text{m}^2$ ）は、晴天時の地上で受ける太陽の光パワー密度 $1\text{kW}/\text{m}^2$ の64万倍もある。このような高密度の光の場合には、光とそれを照射された物質間にさまざまな非線形な相互作用が起こり、その中でも最も起こりやすいのが2光子吸収である。この2光子吸収は、光強度の2乗に比例して起こる吸収であって、通常的光強度では起こらない。そして、D. Dinkelらは、イ

ースト菌に580 nmの光を照射したところ、2光子吸収が観察されたと報告している (Analytica chimica acta 236/1992, Remote two-photon excited fluorescence sensing in a simulated fermentation broth)。この実験では、イースト菌の蛋白質を構成する必須アミノ酸の一種であるトリプトファンが580 nmの2個の光子を吸収し、あたかも580 nmの半波長の290 nmの紫外線を照射されたと同じ励起状態になったのである。すなわち、Ashkinらや坂野らの報告において、Arレーザ(可視光:波長514 nm)で生物損傷が観察されたのは、その波長が可視光領域によるものだけではなく、2光子吸収現象により514 nmの半波長の257 nmの光が照射されたと同じ状態になったからと考えることができる。

【0007】このことより、本発明者らは、大腸菌やイースト菌などの生物粒子をレーザ光で光学トラップする場合、これらを構成する蛋白質や核酸が吸収するとされている150 nm以上、300 nm未満の波長(図4:実線参照)と、2光子吸収により吸収される300 nm以上、600 nm未満の波長(図4:破線参照)のレーザ光を用いた場合には、生物損傷が生ずるという結論に至った。なお、生物粒子には、色素を持つものと持たないものがあり、大腸菌、イースト菌、ゾウリムシなどのように色素を持たないものは、色素による光の吸収は生じないが、ミドリムシ、赤血球、光合成細菌などのように色素を有するものは、その色素により特定の色の光を吸収し、この場合、従来の実験により生物損傷がないとされていた赤外光でも生物損傷を起こす場合がある。

【0008】そこで本発明は、これらの考察に基づき、色素を持たない生物粒子については、可視光領域の波長のレーザ光を用いて生物損傷を起こすことなく光学トラップすることができ、色素を持つ生物粒子についても生物損傷を起こすことなく確実に光学トラップできるようにすることを技術的課題としている。

【0009】

【課題を解決するための手段】この課題を解決するために、本発明に係るレーザトラッピング装置は、微小検体が浮遊する媒質中に焦点位置を有する集光光学系を通して前記媒質中にレーザ光を照射し、当該レーザ光を前記集光光学系の焦点位置に集光させてその焦点位置にある微小検体を光学的にトラップするレーザトラッピング装置において、前記レーザ光の波長が、可視光領域に含まれ、且つ、600 nm以上に選定されていることを特徴とする。

【0010】本発明によれば、微小検体を光学トラップするために照射するレーザ光の波長が、600 nm以上であるから、その波長は、生物粒子を構成する蛋白質や核酸に吸収される150~300 nmの範囲外であり、また、2光子吸収により吸収される300~600 nmの範囲外でもあるため、微小検体として色素を持たない

生物粒子を光学トラップする場合に、生物損傷が生ずることがない。しかも、その波長は可視光領域に含まれ、視認することができるので、目に入ったときの危険を回避でき、装置をセットしたときに光学系の調整も容易に行うことができる。また、赤外光に比して波長が短いので、同じ出力の光であれば、トラップ力が強く、さらに、焦点位置のビームスポット径は波長に比例するので、赤外光に比してビームスポット系は小さくなり、赤外光に比して小さい検体をトラップしやすくなる。そして、レーザトラッピング装置に使用するレンズ、ミラーその他の光学要素は、低コストに抑えるために一般顕微鏡用の汎用品を使用しても、透過率や収差などの光学性能を低下させることがなく、装置全体のコストを低減できる。

【0011】また、本発明に係る他のレーザトラッピング装置は、前記微小検体として色素を有する生物粒子を用いる場合に、前記レーザ光の波長が、600 nm以上で、且つ、その微小検体の色素が吸収しない波長に選定されていることを特徴とする。この発明によれば、微小検体を光学トラップするために照射するレーザ光の波長が、600 nm以上であるから、その波長は、生物粒子を構成する蛋白質や核酸に吸収される150~300 nmの範囲外であり、また、2光子吸収により吸収される300~600 nmの範囲外でもあり、さらに、微小検体の色素により吸収しない光の波長に選定されているので、微小検体として色素を持つ生物粒子を光学トラップする場合に、生物損傷が生ずることがない。

【0012】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施形態を、図面に基づいて具体的に説明する。図1は本発明に係るレーザトラッピング装置を用いたマイクロコンピュータを示すフローシート、図2はそれに使用するセルプレート、図3(a)~(e)はその操作手順を示す説明図である。

【0013】図中1は、セルプレート2に保持させた媒質液に分散浮遊している微生物(微小検体)から選んだ一の微生物3を取り出すマイクロコンピュータであって、前記セルプレート2が倒立顕微鏡4のステージ5上に置かれている。このマイクロコンピュータ1は、顕微鏡4の視野下で、媒質液に分散浮遊した微生物中から選んだ微生物3にレーザ光を照射してその照射位置にある微生物3をトラップするレーザトラッピング手段7と、微生物3をトラップした状態で、セルプレート2を移動させるか、又は、レーザ光を走査させて、当該微生物3を他の微生物から分離させる検体分離手段8とを備えている。

【0014】媒質液を保持するセルプレート2は、倒立顕微鏡4のカバーガラスとなる0.17 mmのプレート本体10の上に、多数の微生物が分散浮遊している媒質液を貯留する第一セル11Aと、微生物が浮遊していない媒

7

質液を貯留する第二セル11Bが、その上面を開口して所定間隔離れて形成されると共に、微生物の自由移動を阻止する狭小な誘導路12で連通されている。

【0015】したがって、誘導路12は、その底面が倒立顕微鏡4のカバーガラスとなる光学平面で形成されると共に、その途中には、微生物が浮遊しない媒質液を貯留するバッファセル11Cがその上面を開口して形成され、これにより、誘導路12が、第一セル11Aとバッファセル11Cとを連通する第一の誘導路12aと、バッファセル11Cと第二セル11Bとを連通する第二の誘導路12bとから形成される。

【0016】そして、前記各セル11A~11Cは、プレート本体10の表面に形成された媒質液注入口となる大径の凹部13A~13C内に形成され、各セル11A~11Cの上面開口部が、凹部13A~13Cの底面を水平方向にスライドされる蓋体14A~14Cによって開閉されるようになされている。この場合に、凹部13A~13Bと各蓋体14A~14Cが互いに接する面は、光の波長オーダーの隙間で摺接するように光学研磨されている。これにより、蓋体14A~14Cをスライドさせても、誘導路12内に流れを作らずに各セルを開閉することができる。

【0017】なお、大腸菌を分離するセルプレート2において、各凹部13A~13Cは直径9mm×深さ2mm程度、各セル11A~11Cは直径2mm×深さ1.8mm程度、セル11A、11C間及びセル11C、11B間を連通する誘導路12a及び12bの長さは夫々約9mm程度、誘導路12a、12bの断面は縦横各0.1mm程度に形成されている。

【0018】倒立顕微鏡4は、ステージ移動装置15によりX-Y方向に移動可能に配設されたステージ5の下方に対物レンズ16が配設されると共に、その光軸上にセルプレート2内を撮影するCCDカメラ17がセットされ、当該CCDカメラ17で撮影された像がディスプレイ装置18に表示される。なお、対物レンズ16としては例えば倍率100倍、NA=1.30の液浸対物レンズが使用されている。

【0019】そして、前記レーザトラッピング手段7は、倒立型顕微鏡4の対物レンズ16を透過するレーザ光により第一セル11A内の微生物3をトラップするようになされ、レーザ光源19から出力されるレーザ光の光路中には、レーザ光の照射位置をX方向及びY方向に移動させるスキャニングミラー20x、20yを有するスキャニング装置21及びダイクロイックミラー22が介装され、当該ダイクロイックミラー22で反射された反射されたレーザ光が対物レンズ16を透過し、第一セル11A内に集光されるように成されている。また、微小検体として大腸菌などのように色素を持たない生物粒子を光学トラップする場合、前記レーザ光源19から出射されるレーザ光の波長は、可視光領域に含まれ、且

8

つ、600nm以上に選定されており、本例では波長690nmの半導体レーザを使用している。

【0020】また、前記検体分離手段8では、前記レーザトラッピング手段7で特定の微生物3をトラップした状態で、ステージ移動装置15によりセルプレート2を移動させたり、スキャニング装置21によりレーザ光を走査することにより、当該微生物3を前記第一セル11Aから誘導路12を通して第二セル11Bに移動させて第一セル11A内の他の微生物から分離させるようになされている。なお、30は、マイクロマニピュレータ1を制御する制御装置であって、その入力側には、CCDカメラ17、キーボード31、マウス32が接続され、その出力側には、ディスプレイ装置18、レーザ光源19の駆動装置33、レーザスキャニング装置21のドライバ34、ステージ移動装置15が接続されている。

【0021】以上が本発明装置の一例であって、次に、その作用について図3(a)~(f)を伴って説明する。まず、セルプレート2をステージ5にセットし、図3(a)に示すように、微生物の存在しない清浄な媒質液を、第二セル11Bが形成された凹部13Bに注ぎ込み、蓋体14Bが媒質液に浸漬されたところで当該蓋体14Bをスライドさせて第二セル11Bの上面開口部を塞ぐ。なお、このとき、第二セル11B内の媒質液は毛管現象により誘導路12b内を流れてバッファセル11C内に流出する。

【0022】次いで、図3(b)に示すように、微生物の存在しない清浄な媒質液を、バッファセル11Cが形成された凹部13Cに注ぎ込み、蓋体14Cが媒質液に浸漬されたところで当該蓋体14Cをスライドさせてバッファセル11Cの上面開口部を塞ぐ。なお、このとき、バッファセル11C内の媒質液は毛管現象により誘導路12a内を流れて第一セル11A内に流出する。

【0023】そして、図3(c)に示すように、多数の微生物が分散浮遊する媒質液を、第一セル11Aが形成された凹部13Aに注ぎ込み、蓋体14Aが媒質液に浸漬されたところで当該蓋体14Aをスライドさせて第一セル11Aの上面開口部を塞ぐ。このとき、蓋体14Aと凹部13Bとの摺接面は光学研磨されているので、蓋体14Aをスライドすることによって、第一セル11A内の媒質液が誘導路12a、12bを通して、バッファセル11Cや第二セル11B内に流出することはない。また、各セル11A~11Cの上面開口部は全て蓋体14A~14Cにより閉鎖されており、しかも各蓋体14A~14Cは媒質液に浸漬されているので、媒質液が蒸発したとしても、蓋体14A~14Cで塞がれた各セル11A~11Cの外側の凹部13A~13C内に貯留されている媒質液が蒸発することとなり、各セル11A~11C内にはその影響が及ばない。したがって、セル11A~11C内の媒質液は停止された状態に維持され、誘導路12内に流れが形成されることもない。

【0024】この状態で、第一セル11A内をディスプレイ装置14で観察しながら、任意の微生物3に対し、スキャニング装置22によりレーザ光を照射すれば、図3(d)に示すようにその位置で微生物3がトラップされる。このとき、レーザ光の波長は690nmに選定されているので、微生物3が光吸収及び2光子吸収を起こす波長150~600nmから外れているので、微生物3を損傷することなく光学トラップを行うことができる。

【0025】この状態で、図3(e)に示すように、ステージ移動装置15によりステージ5を移動させることにより、レーザ光でトラップした特定の微生物3を第一セル11Aから誘導路12aを通りバッファセル11Cに移動し、さらに、誘導路12bを通り第二セル11Bまで移動する。このとき、第一セル11Aと第二セル11Bを連通する誘導路12が、微生物の自由移動を阻止し得る程度に狭小に形成されているので、第一セル11A内の他の微生物が誘導路12を泳いで第二セル11Bに達する確率は極めて低く、したがって、第二セル11Bにはレーザ光でトラップした特別の微生物3のみが存在することになる。

【0026】また、本例では、誘導路12の途中にバッファセル11Cが形成されているので、万一、微生物が泳いで第一セル11Aから誘導路12aを通りバッファセル11Cに達したとしても、再びバッファセル11Cから誘導路12bを通して第二セル11Bに達することは皆無に等しく、したがって、第二セル11B内には、レーザ光でトラップした特定の微生物3のみが存在し、他の微生物は存在しない。したがって、このセルプレート2を用いて第二セル11Bの微生物を培養すれば、または、マイクロピペットなどにより当該微生物を移植して培養すれば、例えば遺伝子操作した大腸菌を1個の菌から100%の収率で純粋培養することがきる。

【0027】なお、バッファセル11Cは、誘導路12の途中に一つだけ形成する場合に限らず、必要に応じて任意の数だけ形成することができ、場合によっては、設けなくてもよい。また、微小検体としては、大腸菌のような微生物に限らず、微粒子などであってもよい。さらに、本例では、セルプレートに第一セル11Aと第二セル11Bを一つずつ形成した場合について説明したが、本発明はこれに限らず、第二セル11Bを複数形成して、夫々を誘導路12を介して第一セル11Aと連通させるようにしてもよい。なお、この場合に、全ての第二セル11Bに微生物の浮遊してない媒質液を注入して、夫々の上面開口部を蓋体14Bで閉じた後、最後に、微生物の分散浮遊している媒質液を第一セル11Aに注入させて、その上面開口部を蓋体14Aで閉じればよい。

【0028】このように、本例によれば、微小検体3を光学トラップするために照射するレーザ光の波長が690nmであるから、その波長は、生物粒子を構成する蛋

白質や核酸に吸収される150~300nmの範囲外であり、また、2光子吸収により吸収される300~600nmの範囲外でもあるため、微小検体として色素を持たない生物粒子を光学トラップする場合に、生物損傷が生ずることがない。しかも、その波長は可視光領域に含まれ、視認することができるので、目に入ったときの危険を回避でき、マイクロマニピュレータ1を組み立てるときなどに光学系の調整も容易に行うことができる。また、赤外光に比して波長が短いので、同じ出力の光であれば、トラップ力が強く、さらに、焦点位置のビームスポット径は波長に比例するので、赤外光に比してビームスポット系は小さくなり、赤外光に比して小さい検体をトラップしやすくなる。そして、マイクロマニピュレータ1に使用するレンズ、ミラーその他の光学要素として、比較的安価な一般顕微鏡用の汎用品を使用しても、透過率や収差などの光学性能を低下させることがない。

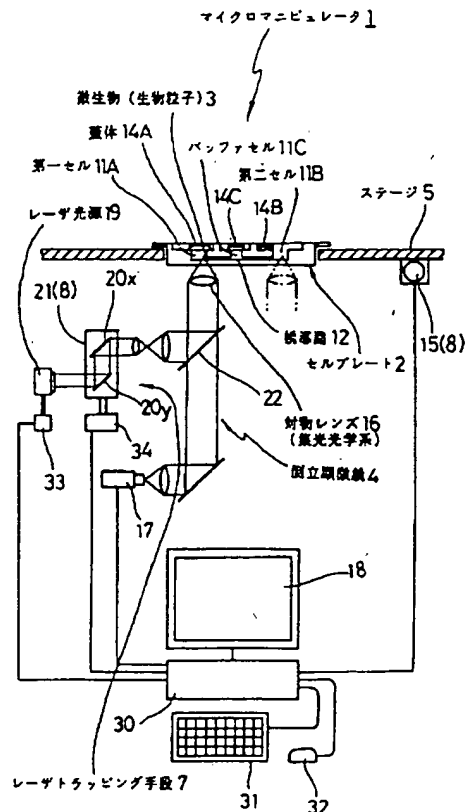
【0029】なお、上述の説明では、微小検体として大腸菌などの色素を持たない微生物を光学トラップする場合について説明したが、微小検体として色素を持つ微生物を光学トラップする場合は、前記レーザトラッピング手段7のレーザ光源19として、そのレーザ光の波長が、600nm以上で、且つ、その微小検体の色素により吸収されない波長に選定されている。例えば、ミドリムシを微小検体とする場合、その色素となるクロロフィルは、400~700nmの光を吸収をするので、これをトラップする場合には波長が700nm以上のレーザ光を照射しなければならない。また、光合成細菌を微小検体とする場合、その色素となるバクテリオクロロフィルは、400~1100nmの光を吸収をするので、これをトラップする場合には、波長が1100nm以上のレーザ光を照射しなければならない。すなわち、微小検体として色素を持つ微生物を光学トラップする場合は、照射する光の波長が可視光であると赤外光であるに関係なく、従来生物損傷がないとされていた赤外線領域の光を用いても光損傷を生ずることがある。この原因は、その微生物が有する色素により光吸収によるものである。したがって、本発明のように、微生物を構成する蛋白質や核酸による光吸収及び2光子吸収される波長領域150~600nmの範囲外の波長で、且つ、その微生物の色素により吸収されない波長に選定されていれば、光による生物損傷を起こすことなく光学トラップを行うことができる。この場合において、微生物の色素により吸収されない波長として、可視光領域の波長が含まれていれば、その波長の光を用いれば、赤外光を用いる場合に比して前述したような利点があるのは同様である。

【0030】

【発明の効果】以上述べたように、本発明によれば、光学トラップを行うレーザ光の波長が、600nm以上の可視光に選定されているので、生物粒子の光吸収及び2光子吸収を生ずる光の波長150~600nmの範囲外

であるため、微小検体として色素を持たない生物粒子を光学トラップする場合に生物損傷が生ずることがなく、また、その波長は可視光領域に含まれ視認することができるので、目に入ったときの危険を回避できるだけでなく、装置をセットしたときに光学系の調整も容易に行うことができるという効果を有し、赤外光に比して波長が短いので同じ出力の光であればトラップ力が強く、焦点位置のビームスポット径が赤外光に比して小さいので赤外光に比して小さい検体をトラップすることができ、さらに、レーザトラッピング装置に使用するレンズ、ミラーその他の光学要素は、低コストに抑えるために一般顕微鏡用の汎用品を使用しても、透過率や収差などの光学性能を低下させることがなく、装置全体のコストを低減できるという大変優れた効果を有する。また、微小検体として色素を有する生物粒子を用いる場合に、前記レーザ光の波長が、600nm以上で、且つ、その微小検体の色素が吸収しない波長に選定されているので、従来生物損傷がないとされていた赤外光により光学トラップしたときに生物損傷を生ずるものであっても、生物損傷を起こさずに確実にトラップすることができるという効果を有する。

【図1】



## 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明に係るレーザトラッピング装置を用いたマイクロマニピュレータを示すフローシート。

【図2】それに使用するセルプレートを示す斜視図。

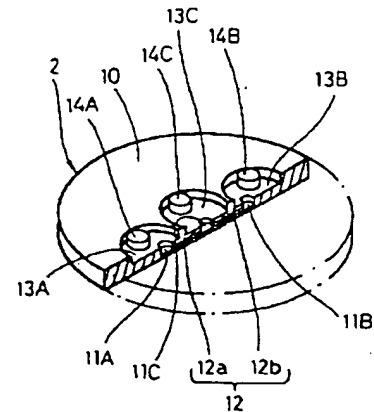
【図3】(a)～(e)はその操作手順を示す説明図。

【図4】大腸菌の吸光度を示すグラフ。

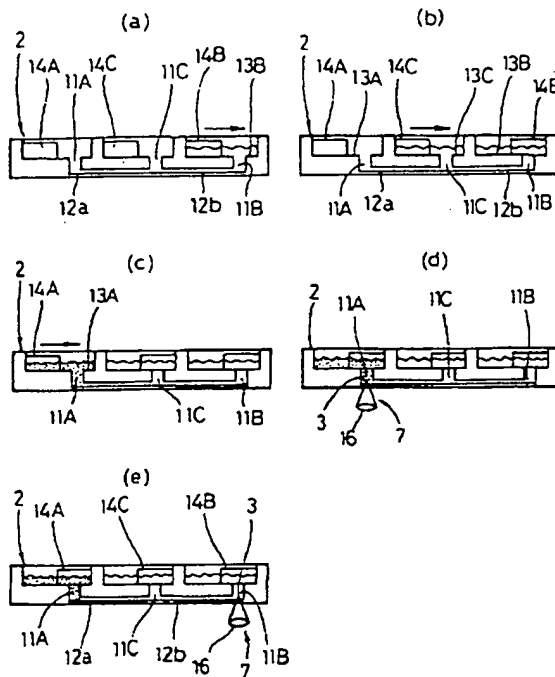
## 【符号の説明】

- 1・・・マイクロマニピュレータ
- 2・・・セルプレート
- 3・・・微生物(生物粒子)
- 4・・・倒立顕微鏡
- 5・・・ステージ
- 7・・・レーザトラッピング手段
- 8・・・検体分離手段
- 10・・・プレート本体
- 11A・・・第一セル
- 11B・・・第二セル
- 12・・・誘導路
- 14A～14C・・・蓋体
- 16・・・対物レンズ(集光光学系)
- 19・・・レーザ光源

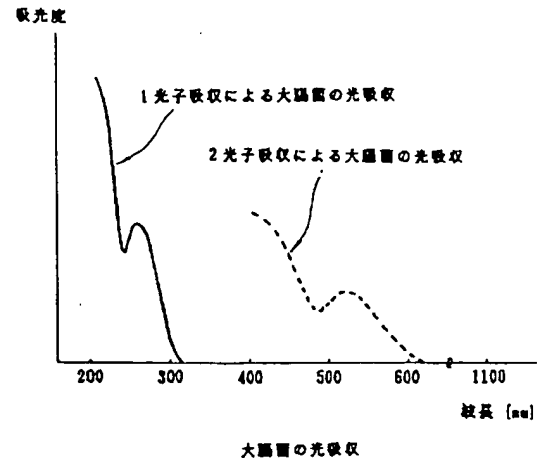
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(72)発明者 西 岡 千 恵  
神奈川県横浜市都筑区茅ヶ崎東三丁目6番  
32号 株式会社モリテックス港北技術セン  
ター内

(72)発明者 堀 尾 浩 司  
神奈川県横浜市都筑区茅ヶ崎東三丁目6番  
32号 株式会社モリテックス港北技術セン  
ター内

(72)発明者 森 戸 祐 幸  
東京都渋谷区神宮前三丁目1番14号 株式  
会社モリテックス内



JPAB

CLIPPEDIMAGE= JP410062332A

PAT-NO: JP410062332A

DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 10062332 A

TITLE: LASER TRAPPING DEVICE AND MICROMANIPULATOR USING IT

PUBN-DATE: March 6, 1998

INVENTOR-INFORMATION:

NAME

KANO, SHUJI

NISHIOKA, CHIE

HORIO, KOJI

MORITO, YUKO

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME

COUNTRY

MORITEX CORP

N/A

RES DEV CORP OF JAPAN

N/A

APPL-NO: JP08223358

APPL-DATE: August 26, 1996

INT-CL\_(IPC): G01N015/14

ABSTRACT:

PROBLEM TO BE SOLVED: To perform an optical trapping without causing a biological damage by selecting the wavelength of a later beam which is converged to the focal position of a converging optical system to optically trap a minute subject situated in the converged position so as to be contained in a visual light area and has a specified wavelength or more.

SOLUTION: A micromanipulator 1 has a laser trapping means 7 for emitting a laser beam to a microorganism 3 selected from microorganisms dispersed and floated in a medium solution under the field of view of an inverted microscope 4 to trap the microorganism 3 situated in the emitted position; and a subject separating means for moving a cell plate 2 or scanning a laser beam in the state where the microorganism 3 is trapped to separate the microorganism 3 from other microorganisms. The laser trapping means 7 traps the microorganism 3 within a first cell 11A by the laser beam transmitted by the objective lens 16 of the inverted microscope 4. The wavelength of the laser beam emitted from a laser beam source 19 is selected so as to be contained in a visual light area and have a wavelength of 600nm or more.

COPYRIGHT: (C)1998,JPO